

JP07031478A

MicroPatent Report**DNA FRAGMENT HAVING PROMOTER FUNCTION IN  
CORYNEFORM BACTERIUM****[71] Applicant:** MITSUBISHI CHEM**[72] Inventors:** KOHAMA KEIKO;  
KOBAYASHI MIKI;  
KURUSU YASUROU;  
YUGAWA HIDEAKI**[21] Application No.:** JP05183597**[22] Filed:** 19930726**[43] Published:** 19950203

GTGAGGCGA TGTGCGTA CTCGCGTC AGCGCGCG CGCGTGTG 69  
ATCGCGCG CGCGCGCT GTTGTGTA CGCGCGAA TGTGCGCG TATGCGCA 128  
CGCGCGTA CGCGCGTA CGCGCGTC CGCGCGTC CGCGCGTC CGCGCGTC 186  
AGCGCG

[Go to Fulltext](#)**[57] Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject DNA fragment, containing a specific base sequence having the promoter function in a specified coryneform bacterium, having increasing action on the expression intensity of a structural gene and useful for producing, etc., an amino acid, etc. CONSTITUTION: This DNA fragment contains a base sequence, expressed by the formula and having the promoter function in a coryneform bacterium derived from a gene coding an aspartase in the coryneform bacterium.

**[51] Int'l Class:** C12N01509 C12N01509 C12R00113

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-31478

(43)公開日 平成7年(1995)2月3日

(51)Int.Cl.* C 12 N 15/09 // (C 12 N 15/09 C 12 R 1:13)	識別記号 ZNA	序内整理番号 9050-4B	F I	技術表示箇所 ZNA A (C 12 N 15/00 ZNA A
審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全7頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-183597	(71)出願人 000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日 平成5年(1993)7月26日	(72)発明者 小浜 恵子 茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
	(72)発明者 小林 幹 茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
	(72)発明者 久留主 泰朗 茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
	(74)代理人 弁理士 山本 隆也 最終頁に続く

(54)【発明の名称】コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片

(57)【要約】

【構成】 プレビバクテリウム・フラバムMJ-233  
から単離されたアスパルターゼをコードする遺伝子に由  
来する188塩基対より成るプロモーター機能を有する  
DNA断片。

【効果】 このプロモーター機能を有するDNA断片  
を、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラス  
ミドベクターに組み込み宿主コリネ型細菌に導入した時  
に、該構造遺伝子が高発現する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コリネ型細菌内のアスパルターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する下記の塩基配列：

GCTAACGCCA TCATGGATAA GCTTGCTGGA CTCGGCGCTG AAGCCATCCT GGCTTCTGAA 60  
ATCCGGCATCG CCGGCATCTA GTTTTAACTA CCCCCGAAA TGTAGTGGGG TAGTTCCACA 120  
CTGCCTCTTA CAAGTACGTA GGATAATCCA CAGCACCATC GTGATTTCTT TCAACTTGTG 180  
AGAGGCAG 188

を含むDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はコリネ型細菌内のアスパルターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する新規なDNAを含むDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】プレビバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌は、アミノ酸、有機酸、プリンスクレオチド等を生産する工業的に有用な微生物であるが、組換えDNA技術の導入による菌株の育種改良は、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等に比べて遅れている。特に、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子のコリネ型細菌内での発現のために必要なプロモーターの構造に関する知見は極めて少く、コリネ型細菌を宿主として用いて構造遺伝子を発現させようとする場合にはかなり問題となっている。

【0003】一方、本発明者らは先にコリネ型細菌染色体より、フマル酸とアンモニアからL-アスパラギン酸への変換反応を触媒する酵素、すなわちアスパルターゼ (EC 4.3.1.1) をコードする遺伝子DNAを単離し提案した (特開平5-30977号明細書参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の主たる目的は、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子をコリネ型細菌内で確実に発現せしめるようなプロモーター機能を有する新規なDNA断片を取得することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNAを鋭意検索した結果、本発明者らが先に提案したアスパルターゼをコードする遺伝子 (特開平5-30977号明細書参照) 上流の188bpのDNAがコリネ型細菌内でプロモーター機能を有することを見い出し本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、コリネ型細菌内のアスパルターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する後記配列表の配列番号：1に示される188bpの塩基配列を含むDNA断片である。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本明細書において、「プロモーター機能を有するDNA」とは、遺伝子の転写を開始するためにRNAポリ

ドする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター

機能を有する下記の塩基配列：

GCTAACGCCA TCATGGATAA GCTTGCTGGA CTCGGCGCTG AAGCCATCCT GGCTTCTGAA 60  
ATCCGGCATCG CCGGCATCTA GTTTTAACTA CCCCCGAAA TGTAGTGGGG TAGTTCCACA 120  
CTGCCTCTTA CAAGTACGTA GGATAATCCA CAGCACCATC GTGATTTCTT TCAACTTGTG 180  
AGAGGCAG 188

メラーゼが特異的に結合するDNA上の領域であって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラスミドベクターに組み込まれ宿主コリネ型細菌に導入された時に、該構造遺伝子の発現強度の増加作用を有するDNAを意味する。

【0007】本発明のプロモーター機能を有するDNA断片は、コリネ型細菌内のアスパルターゼをコードする遺伝子に由来するものであり、該遺伝子を含むDNA断片から得ることができる。上記アスパルターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株；プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等が有利に使用される。

【0008】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである。すなわち、A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0009】先ず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3AIを用いて、DNA断片の大きさが約20～30kbになるよう部分分解する。得られたDNA断片をコスミドベクター、例えばpWE15に挿入し、このコスミドを、λDNA *in vitro* Packaging Kitを用いる形質導入により、アスパルターゼ遺伝子が欠損した大腸菌変異株 (Journal of General Microbiology, 130, p1271-1278, 1984参照) に導入する。この大腸

菌変異株をL-グルタミン酸を单一炭素源とする培地に塗沫する。

【0010】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片は、大きさが約20~30 kbと大きく、実用的ないので、さらに短かい断片に特定化する必要がある。

【0011】次に、上記で得られたA断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法による形質転換により、前記アスパルターゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、この大腸菌変異株をL-グルタミン酸を单一炭素源とする培地に塗沫する。

【0012】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、前記プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素Sau3A Iの部分分解により切り出し、さらにそれを制限酵素EcoR Iで切り出すことによって得られる大きさが約2.4 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0013】この約2.4 kbのアスパルターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切

断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダファージ( $\lambda$  phage)のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ( $\phi$  X 174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】

【表1】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>Ava</u> I	1	1.7, 0.7
<u>Cla</u> I	1	1.3, 1.1
<u>Hind</u> III	2	1.7, 0.35, 0.35

【0016】上記したプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoR Iで切り出すことにより得られる大きさが約2.4 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約2.4 kbのDNA断片の塩基配列中に526個のアミノ酸をコードする1578の塩基対から成るオープンリーディングフレームが存在し(特開平5-30977号明細書参照)、該オープンリーディングフレームの上流部分がプロモーター機能を有すると考えられた。

【0017】次に、該オープンリーディングフレームの上流部分のプロモーター機能を有すると考えられるDN

A領域の上流および下流の配列に相当する適当な塩基配列、例えば後記配列表の配列番号: 2および配列番号: 3に示される塩基配列を化学合成し、これをプライマーディナとして用いて、プロモーター機能を有すると考えられるDNA領域を増幅することができる。プライマーディナの合成は、例えばベックマン社製DNA合成機System-1 Plusを用いて合成でき、DNA領域の増幅は、例えばDNAサーマルサイクラー408型(宝酒造社製)を用いてNature, 324, p163(1986年)に記載の方法により行うことができる。

【0018】かくして得られる増幅DNAをコリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクターに組み込むことによって該増幅DNAのプロモーター機能を確認することができる。「コリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクター」としては、例えば、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片(a)と、

プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片（b）（以下これを「発現されるべき遺伝子」と略称することがある）とを保有するプラスミドであれば特に制限はない。このプラスミド検出用ベクターの具体例としては、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片（a）としてブレビバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）由来のプラスミドpBY503を制限酵素KpnIで切り出すことによって得られる約6kbのDNA断片、プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片（b）としてエシェリヒア・コリのトランポゾンTn9由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）をコードする遺伝子を保有するプラスミドpPR3（特開平3-147792号明細書参照）を挙げることができる。

【0019】次に、上記プラスミド検出用ベクターを用いてプロモーター機能を有するDNA断片の検出法を述べる。先ず、上記プラスミド検出用ベクターを、それ自体既知の通常用いられる形質転換法、例えば電気パルス法[Agricultural and Biological chemistry, 54, 443, (1990) 参照]等で前記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)へ導入し、形質転換株を適当な培地で培養し、プロモーターが欠失している発現されるべき遺伝子（b）が発現しないことを確認しておく。ここで、プロモーターが欠失している発現されるべき遺伝子（b）の発現の有無および発現強度の測定は、該遺伝子（b）が薬剤耐性遺伝子である場合はその薬剤を含有する選択培地で培養し、形質転換株の薬剤感受性を調べることで容易に行うことができる。また発現の有無および発現強度は、形質転換株を通常用いられる培地で培養し、培地中の発現されるべき遺伝子（b）の発現産物を、該遺伝子の発現産物の性質を利用して調べることもできる。

【0020】次に、発現されるべき遺伝子（b）がコリネ型細菌内で発現していないことが確認できたプラスミド検出用ベクター、例えばpPR3の発現されるべきCAT遺伝子の上流部位を適当な制限酵素、例えばBamHIで解裂し、該部位に前記A断片由来の増幅DNAをDNAリガーゼ処理により連結し、コリネ型細菌へ電気パルス法等により導入する。得られる形質転換株を培養し、前記した発現されるべき遺伝子（b）の確認法により、形質転換株の該遺伝子の発現の有無及び強度を調べることにより、挿入されたDNA断片のプロモーター機能を確認することができる。

【0021】かくして得られる本発明のプロモーター機能を有するDNA断片としては、後記配列表の配列番

号：1に示される188塩基対より成るDNAを挙げることができる。上記した後記配列表の配列番号：1に示される塩基配列を包含して成る本発明のプロモーター機能を有するDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたA断片に由来するもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0022】また、前記の如くブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから増幅して得られる本発明のDNA断片は、プロモーター機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のプロモーター機能を有するDNA断片に包含されるものである。

【0023】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかしながら、下記の実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、これによって本発明の範囲は明らかに限定されるものではない。

【0024】実施例1

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のプロモーター機能を有するDNA断片およびアスパルターゼ構造遺伝子を含むDNA断片（A断片）のクローニング（A）ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4$  4~6 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カゼミノ酸5g、ビオチン200 $\mu$ g、塩酸チアミン200 $\mu$ g、グルコース20g、蒸留水1l〕1lに、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液1.5mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu$ g/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10~12℃)し、上清液分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層

の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5) - 1mM EDTA - 2Na溶液5mlを加え、4°Cで一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0025】(B) 組換体の創製

上記(A)項で得たプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA90μlを制限酵素Sau3AI 1unitを用い、37°Cで20分間反応させ部分分解した。この部分分解DNAにコスミドpWE15(ストラタジーン社製)を制限酵素BamH Iで切断した後、脱リシン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4°Cで15時間反応させ、結合させた。

【0026】(C) A断片を含むコスミドの選抜

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルターゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリJRG1174(aspa23)である[( )内はアスパルターゼ遺伝子型(Genotype)を示す、またこの菌株の詳細および取得方法については、Journal of General Microbiology, 130, p1271-1278(1984)参照]。

【0027】上記(B)項で得たコスミド混液を用い、前記エシェリヒア・コリJRG1174株を形質導入し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1g, L-グルタミン酸ナトリウム塩30mM及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗沫した。なお形質導入には、宝酒造より販売されているλ-DNA in vitro Packaging Kitを用いて行った。培地上の生育株を常法により、液体培養し、培養液よりコスミドDNAを抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミドpWE15の長さ8.8kbのDNA断片に加え、長さ約30kbのDNA断片が認められた。本コスミドをpWE15-Aspと命名した。

【0028】(D) コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片およびアスパルターゼ構造遺伝子を

含むDNA断片(A断片)のプラスミドpHSG399へのサブクローニング

上記(C)項で得たコスミドpWE15-Aspに含まれるDNA挿入断片は約30kbと大きく、実用的でないので、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するため、プラスミドpHSG399(宝酒造より市販)ヘアスパルターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0029】上記(C)項で得たコスミドpWE15-Aspを制限酵素EcoR Iで切断したものと、プラスミドpHSG399を制限酵素EcoR Iで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ、結合させた。

【0030】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)によりエシェリヒア・コリJRG1174(aspa23)株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g, L-グルタミン酸ナトリウム30mM及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗沫した。

【0031】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約2.4kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約2.4kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0032】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0033】

【表2】

表2 プラスミドpHSG399-Asp

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
<u>Ava</u> I	2	3.6, 1.0
<u>Cla</u> I	1	4.6
<u>Eco</u> R I	2	2.4, 2.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpHSG399-Aspと命名した。

【0034】以上により、コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片およびアスパルターゼ構造遺

伝子を含む大きさが約2.4kbのDNA断片(EcoR I断片)を得ることができた。

【0035】実施例2

コリネ型細菌内でプロモーター機能を有する断片および

### アスパルターゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

実施例1の(D)で得られた大きさが約2.4 kbのコリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片およびアスパルターゼ構造遺伝子を含むDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 74, 5463, 1977)により図1に示した戦略図に従って決定した。その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルターゼ構造遺伝子は526アミノ酸をコードする1578塩基対より構成され、該オープンリーディングフレームの上流部分にプロモーター機能を有すると考えられる後記配列表の配列番号:1に示される188塩基対よりなる配列が存在した。

### 【0036】実施例3

#### プロモーター機能を有するDNA断片の単離

##### (A) DNA領域の増幅に使用するプライマー-DNAの合成

実施例2において決定したアスパルターゼ構造遺伝子上流の188 bpの配列を基に、該領域のみを特異的に増幅するために下記のプライマー-DNAを合成した(アンダーライン部分はBamHI部位)。

【0037】5'-CCGGATCCGCTAACGCCATCATGGAT-3' (配列番号: 2)  
5'-CCGGATCCCACAAAGTTGAAGGAAATC-3' (相補鎖; 配列番号: 3)

プライマー-DNAの合成はベックマン社製DNA合成機System-1 plusを用いて行った。

##### 【0038】(B) プロモーター機能を有するDNA断片の増幅

反応液[50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μg/mlゼラチン, 200 μM dNTPs, 250 pmolプライマー]に、2.5 unitsのTaqポリメラーゼ、1 ngのDNAを添加し、ディナーチャ-94℃1分間、アニーリング37℃、2分間、ポリメライゼーション72℃3分間の反応を、DNAサーマルサイクラー-408型(宝酒造社製)で25回繰り返すことによりDNA断片を増幅させた。増幅DNA断片の確認は4%アガロースゲル電気泳動により188 bpのDNA断片を認ることにより行った。

### 【0039】実施例4

#### プロモーター機能を有するDNA断片のプラスミドpPR3への導入

特開平3-147792号明細書の記載に基いて調製したプラスミドpPR3 0.5 μgと制限酵素BamHI (5 units)を37℃で1時間反応させ、プラスミ

ドDNAを完全に分解した。

【0040】実施例3で調製したプロモーター機能を有するDNA断片とプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50 mMトリス緩衝液pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mMジチオスレイトール、1 mM ATP及びT4DNAリガーゼ1 unitになるよう各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリHB101のコンビテントセル(宝酒造社製)を形質転換した。

【0041】形質転換株は50 μg/ml(最終濃度)のカナマイシンを含むL培地(トリプトン10 g、酵母エキス5 g、NaCl 5 g、蒸留水1 l、pH 7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これら生育株のプラスミドをアルカリ-SDS法(T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; "Molecular cloning" (1982) 90~91参照)により抽出した。

【0042】得られたプラスミドは電気パルス法により、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)プラスミド除去株へ形質転換し、アルカリ-SDS法を用いてプラスミドを抽出した。このプラスミドの制限酵素BamHI、KpnI、SacI等の制限酵素による切断パターンによってpPR3に前記増幅DNAが組み込まれていることを確認し、このプラスミドを"pPR3-A-sp"と命名した。

### 【0043】実施例5

プロモーター強度の測定: 実施例4でpPR3に挿入したプロモーターの強度を、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)の活性を測定することによって調べた。

【0044】pPR3を保有するプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株とpPR3-A-spを保有するプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株をそれぞれ、実施例1の(A)項に記載の半合成培地A培地にカナマイシンを50 μg/ml加えた培地10 mlの入った試験管で一晩前培養し、その培養液を上記の培地100 mlの入った三角フラスコで約6時間培養後集菌し、CATの活性測定に用いた。CATの活性はW. V. Shawらの方法(J. Bacteriology Jan. (1968) 28~36参照)により測定した。その結果、pPR3-A-spを有するMJ-233株は、プロモーターの挿入されていないpPR3を有するMJ-233株の約25倍のCAT活性をもっていた。

### 【0045】

#### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ：188  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：genomic DNA  
起源

配列：

GCTAACGCCA TCATGGATAA GCTTGCTGGA CTCGGCGCTG AAGCCATCCT GGCTTCTGAA 60  
ATCCGGCATCG CCGCGATCTA GTTTTAACTA CCCCCGAAAA TGTAGTGGGG TAGTTCCACA 120  
CTGCGCTTTA CAAGTACGTA GGATAATCCA CAGCACCATC GTGATTTCCT TCAACTTGTG 180  
AGAGGCAG 188

【0046】配列番号：2

配列の長さ：26

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成DNA  
配列：

CCGGATCCCC TAACGCCATC ATGGAT

【0047】配列番号：3

配列の長さ：26

配列の型：核酸

生物名：ブレビバクテリウム フラバム  
株名：MJ 233  
配列の特徴  
特徴を表す記号：Promoter  
存在位置：1-188  
特徴を決定した方法：E

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

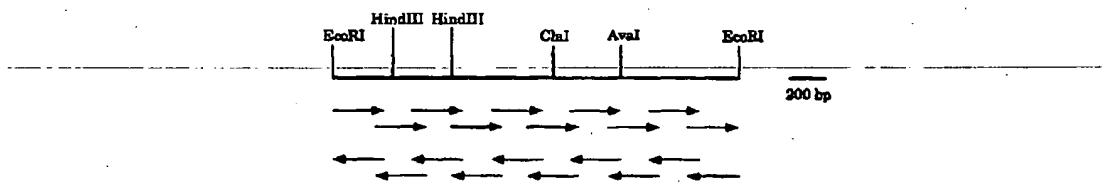
配列：

CCGGATCCCC CAAGTTGAAG GAAATC

【図面の簡単な説明】

【図1】コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNAおよびアスパルターゼ構造遺伝子を含む大きさが約2.4kbのDNA断片の制限酵素切断点地図、および塩基配列決定のための戦略図。

### 【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

府内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内